白藜芦醇通过激活去乙酰化酶 1/腺苷一磷酸激活的蛋白激酶信号通路影响牛脂肪细胞凋亡

成海建[1, 2] 游 伟[1, 2*] 靳 青[1, 2] 刘倚帆[1, 2] 万发春[1, 2] 宋恩亮[1, 2] 刘桂芬[1, 2] 谭秀文[1, 2] 张相伦[1, 2] 刘晓牧[1, 2**]

（1.山东省农业科学院畜牧兽医研究所，济南 250100；2.山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室，济南 250100）

摘 要：本试验旨在研究植物提取物白藜芦醇（RES）对牛皮下脂肪细胞凋亡率以及去乙酰化酶1（SIRT1）/腺苷一磷酸激活的蛋白激酶（AMPK）信号通路关键因子的mRNA和蛋白质表达量的影响。选取18月龄鲁西黄牛的皮下前体脂肪细胞，在细胞分化的第0天，更换为RES浓度分别为0（对照）、100、200和400 μmol/L的培养液处理48 h，每组设3个重复。应用Hoechst 33342染色检测细胞凋亡的形态学变化，流式细胞分析仪检测细胞凋亡率，荧光定量PCR（qPCR）和免疫印迹试验（Western-blot）分别检测SIRT1/AMPK信号通路上的关键因子*SIRT*1、*AMPKα*、叉头转录因子1（*FoxO*1）、B细胞淋巴瘤/白血病-2（*Bcl*-2）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（caspase-3）、促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白（*Bax*）的mRNA和蛋白质表达量，并利用油红O染色鉴定脂肪细胞。结果表明，与对照组相比：不同浓度RES处理后的牛皮下脂肪细胞凋亡率均极显著增高（$P<0.01$）；不同浓度RES处理后的*SIRT*1、*AMPKα*、caspase-3、*Bax*的mRNA表达量均显著或极显著提高（$P<0.05$或$P<0.01$），*Bcl*-2的mRNA表达量极显著降低（$P<0.01$）；不同浓度RES处理后的SIRT1、AMPKα、caspase-3的蛋白质表达量均显著或极显著提高（$P<0.05$或$P<0.01$）；200和400 μmol/L RES处理后，*FoxO*1的mRNA和蛋白质表达量显著或极显著提高（$P<0.05$或$P<0.01$），Bax的蛋白质表达量极显著提高（$P<0.01$），Bcl-2的蛋白质表达量极显著降低（$P<0.01$）。100 μmol/L RES处理后时，*FoxO*1的mRNA和蛋白质表达量以及Bcl-2、Bax的蛋白质表达量均与对照组差异不显著（$P>0.05$）。由此可见，RES通过激活SIRT1/AMPK信

收稿日期：2017-06-11
基金项目：国家自然科学基金（31402098，31601966）；国家科技支撑计划资助项目（2015BAD03B04）
作者简介：成海建（1978—），男，山东菏泽人，助理研究员，硕士，主要从事肉牛营养与遗传育种研究。E-mail: 98061107@163.com
*同等贡献作者
**通信作者：刘晓牧，副研究员，E-mail: xmliu2002@163.com

号通路，同时激活通路下游的*FoxO*1，促进了牛皮下脂肪细胞的凋亡，为通过营养调控技术降低牛皮下脂肪沉积提供了一定的理论基础。

关键词：去乙酰化酶 1；腺苷一磷酸激活的蛋白激酶；叉头转录因子 1；白藜芦醇；牛；脂肪细胞；凋亡

中图分类号：S823　　　　　　　　文献标识码：　　　　　　　　　文章编号：

脂肪细胞凋亡，即能量储存的死亡。通过凋亡来调整脂肪细胞的数目被认为是脂肪组织生长和分化过程中维持正常生理机能所必需的，细胞凋亡存在整个脂肪细胞分化过程中，和增殖分化共同维持机体细胞数目的恒定[1]。对脂肪细胞凋亡过程及其调节机制进行深入研究，为治疗人类肥胖相关疾病、控制动物体脂沉积进而改善肉品质，具有重要的研究意义。

20世纪90年代发现人类脂肪细胞凋亡后，才将减脂减重、脂肪细胞数目减少与脂肪细胞凋亡联系起来[2]。随后许多学者对脂肪细胞凋亡过程及其调节机制进行了更为深入的研究，但这些研究主要集中在3T3-L1脂肪细胞系[3]和人、鼠原代培养的脂肪细胞以及猪的前体脂肪细胞。本研究团队初步探讨了鲁西黄牛皮下前体脂肪细胞和肌内前体脂肪细胞的凋亡差异，发现去乙酰化酶1（sirtuin type 1，SIRT1）通过叉头转录因子1（forkhead box protein O1，*FoxO*1）及其靶基因来调控肉牛前体脂肪细胞凋亡，并且皮下脂肪细胞*SIRT*1基因表达量和凋亡率均高于肌间脂肪细胞[4]，但调控机制需要进一步深入研究。SIRT1是依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD^+）的组蛋白去乙酰化酶，为沉默信息调节因子2(silent information regulator2，Sir2)家族成员之一[5]，与细胞增殖、分化、衰老、凋亡和代谢密切相关，已成为生命科学领域研究的热点之一。腺苷一磷酸激活的蛋白激酶（adenosine monophosphate activated protein kinase，AMPK）能与腺苷一磷酸（adenosine monophosphate，AMP）结合，通过AMP感知细胞的能量水平和代谢平衡水平来调节酶的活性，被称为“能量开关”，参与细胞增殖和凋亡的调控[6]。AMPK作为能量感受器和调节器，成为众多热点信号通路的整合关键点，AMPK和SIRT1之间存在内在联系，从而在调节能量代谢过程中起着重要的调控作用。AMPK与SIRT1的复杂关系及其与上下游的信号分子在脂肪细胞凋亡中的作用值得进一步深入研究。

白藜芦醇（resveratrol，RES）作为一种非黄酮类多酚化合物，主要来源于花生、葡萄（红葡萄酒）、

虎杖、桑椹等植物，具有多种生物活性和药理作用，如抗氧化、神经及心血管保护、抗肿瘤和抗衰老等作用[7-8]。RES常用来作为SIRT1的激活剂，在人和模型动物上进行了大量研究，尤其是在表观遗传学调控方面取得了令人瞩目的成果。但RES作为植物提取物，在动物尤其在反刍动物上进行的研究基本上集中在表现型方面，很少涉及到机理方面。如在绵羊上做了有关RES降低甲烷排放的研究[9]；在奶牛饲粮中添加葡萄渣后，改变了瘤胃细菌和古菌菌落，同时降低了大约20%的甲烷产量[10]。RES对动物生长、营养物质消化以及与机体表观遗传机制调控之间作用的认识和研究还存在许多空白，需要系统详细的研究。因此，本试验通过研究RES对肉牛皮下脂肪细胞凋亡率以及SIRT1/AMPK信号通路关键基因的mRNA和蛋白质表达量的影响，旨在为通过营养调控技术降低肉牛皮下脂肪沉积提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验动物

选择健康无病、450 kg左右、18月龄的鲁西黄牛阉公牛3头，屠宰后，无菌条件下分离皮下脂肪组织。试验得到山东省农业科学院动物保护和使用委员会的许可（IACUC20060101），并符合相关试验动物福利的规则和制度。

1.2　试验方法

1.2.1　牛皮下脂肪细胞培养[4]

将牛皮下脂肪组织剪成 1 mm^3 大小的组织块，加入胶原酶Ⅰ消化液[杜氏改良 Eagle 培养基/营养混合物 F12(Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F12，DMEM/F12)+1 g/L 胶原酶Ⅰ]，恒温振荡水浴 37 ℃消化 30 min。加入生长培养液[DMEM/F12+10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）]终止消化，200 目细胞筛过滤，滤液用低速离心机（TDL-40B，上海安亭）1 385×g 离心 5 min，弃上清液，加入 DMEM/F12 洗（692.5×g，离心 10 min）2 次后，加入生长培养液混匀，制成细胞悬液，计数、接种，即获得牛前体脂肪细胞。待细胞汇合后，更换 DMEM/F12 生长培养液为诱导分化培养液[DMEM/F12+10% FBS+1%青、链霉素原液+5 μg/mL 胰岛素（insulin，INS）+1 μmol/L 地塞米松（dexamethasone，DEX）+0.5 mmol/L 甲基异丁基黄嘌呤（1-methyl-3-isobutylmethylxanthine，IBMX）]，诱导前脂肪细胞分化为脂肪细胞。48 h 后，

更换诱导分化培养液为基础分化培养液（DMEM/F12+10% FBS+1%青、链霉素原液+5 μg/mL INS），以后每 2 d 换 1 次基础分化培养液。一般在第 8 天，有 80%以上的前体脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞。RES、胶原酶Ⅰ、FBS、DMEM/F12 和青、链霉素原液均购自美国 Gibico 公司；INS、DEX 和 IBMX 均购自美国 Sigma 公司。

1.2.2　Hoechst 33342 染色

制作细胞爬片，在细胞分化的第 0 天，更换为 RES 浓度分别为 0（对照）、100、200 和 400 μmol/L 的培养液，每组设 3 个重复，处理 48 h 后，倾去培养液，磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline，PBS)洗细胞 3 次。根据 Hoechst 33342 染色液（上海碧云天生物技术有限公司）说明书，进行染色，利用日本 Olympus 公司 Microscope Digital Camera Model DP71 显微镜成像系统及 Olympus BX51 荧光显微镜下观察拍照。

1.2.3　油红 O 染色

制作细胞爬片，在细胞分化的第 8 天，更换为 RES 浓度分别为 0（对照）、100、200 和 400 μmol/L 的培养液，每组设 3 个重复。48 h 后按油红 O（南京建成生物工程研究所）染色法鉴定脂肪细胞：倾去培养液，PBS 洗细胞 3 次，10%甲醛的等渗盐缓冲液固定 40 min 后，PBS 漂洗，吸取油红 O 工作液 10 mL，油红 O 染色 30 min，60%异丙醇分色 10~20 s，自来水冲洗，苏木精染色 10 min，自来水冲洗，甘油明胶封片拍照[4]。

1.2.4　流式细胞术检测脂肪细胞凋亡

以 $5×10^4$ 个/cm^2 的密度将细胞接种于 25 cm^2 培养瓶，在皮下前体脂肪细胞分化第 0 天，更换为 RES 浓度分别为 0（对照）、100、200 和 400 μmol/L 的培养液，每组设 3 个重复。48 h 后取出培养瓶，分别收集细胞，以磷脂结合蛋白 V 异硫氰酸荧光素（annexin V fluorescein isothiocyanate，Annexin V FITC）/碘化丙啶（propidium iodide，PI）双染法检测细胞凋亡，按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒（江苏凯基生物技术股份有限公司）说明进行操作。同时制备 3 个质控样本设定美国 BD FACSCalibur 流式细胞仪的荧光补偿和设置十字门范围：a）没有染色的细胞；b）仅用荧光标记的 Annexin V FITC 染色的细胞；c）仅用 PI 染色的细胞。结果利用 BD FACSCalibur 分析平台进行分析，通过计数凋亡区细胞数量得出凋亡率。

1.2.5 实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）

以 5×10^4 个/cm^2 密度将细胞接种于 25 cm^2 培养瓶，在细胞分化的第 0 天，更换为 RES 浓度分别为 0（对照）、100、200 和 400 μmol/L 的培养液，每组设 3 个重复。干预 48 h 后取出培养瓶，利用 RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒（北京艾德莱生物科技有限公司）提取细胞总 RNA，利用 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 质量和纯度。采用 Transcriptor^{TM} First Strand cDNA Synthesis Kit（Roche）进行两步法 qPCR 反应体系。反转录后，采用 ChamQTM SYBR$^{®}$ Color qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒（南京诺唯赞生物科技有限公司），取 1 μL cDNA 作模板，加样于 96 孔板，在 Roche 480 荧光定量 PCR 仪上进行反应。反应程序：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，循环 40；熔解曲线 95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 60 s，95 ℃变性 15 s。*SIRT*1 及相关基因引物由上海铂尚生物技术有限公司设计合成，PCR 引物序列参见表 1。以 β-肌动蛋白（β-actin）为内参对照，其他检测基因的相对表达量根据基因表达量相比而推算出来，即相对表达量=$2^{-\Delta\Delta t}$，其中$\Delta t=Ct_{待测基因}-Ct_{内参基因}$，$\Delta\Delta t=\Delta t_{试验组}-\Delta t_{对照组}$，以对照组的基因表达水平设定为 1[11]。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

基因 Genes	序列号 Accession number	引物序列 Primers sequence (5′-3′)	产物大小 Product size/bp
去乙酰化酶1 *SIRT*1	NM_001192980.1	F: AACTTTGCTGTAACCCTGTGAA R: CTGGTGAACTTGAGCCTTCTG	129
腺苷一磷酸激活的蛋白激酶α *AMPKα*	NM_001109802.2	F:CCGTATTATTTGCGTGTTCG R:CGTAGCAGTCCCTGATTTGG	153
叉头转录因子1 *FoxO*1	XM_005900262.2	F:CCTACCTTGGCACGAGAGTG R:CAGCAGAAGCAGATGGGATT	110

半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 Caspase-3	NM_001077840.1	F: CGAGGCACAGAACTGGACTG R: GCCAGGAAAAGTAACCAGGTG	130
促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白 *Bax*	NM_001166486.1	F: GAGGCTGGGACGCCTTTGT R: CATATTTGTTGGCGGCAGGC	172
B细胞淋巴瘤/白血病-2 *Bcl*-2	NM_173894.1	F:CCCTTTTGCTTCAGGGTTTCAT R: TCTCGGGGAGAGTCTGTGTC	199
β-肌动蛋白 β-action	NM_173979.3	F:CACCGCAAATGCTTCTAGGC R:TGTCACCTTCACCGTTCCAG	186

F 和 R 分别代表上游引物和下游引物。

F and R indicate forward and reverse primers, respectively.

1.2.6　免疫印迹试验（Western-blot）

以5×10^4个/cm^{2}的密度将细胞接种于25 cm^{2}培养瓶，在细胞分化的第0天，更换为RES浓度分别为0（对照）、100、200和400 μmol/L的培养液，每组设3个重复。处理48 h后取出培养瓶，提取细胞中的总蛋白，并定量。取30 μg蛋白质利用美国Bio-Rad公司电泳仪Mini-PROTEAN Tetra Cell进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）电泳，然后利用美国Bio-Rad公司电转仪Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer Cell转移到聚偏二氟乙烯膜（PVDF），一抗孵育4 ℃过夜，三羟甲基氨基甲烷吐温（TBST）缓冲液冲洗3次，每次10 min；二抗孵育2 h，缓冲液洗涤3次，发光液发光检测。甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）为总蛋白内参，利用美国Bio-Rad公司Gel Doc XR+凝胶成像系统检测蛋白质条带亮度以及Quantity One软件分析蛋白质条带密度值和表达量；将各目的蛋白质密度值数据与相应的GAPDH密度值比对蛋白质表达量，以各组灰度值与对照组灰度值的比值表示，作相对表达量的柱状分析图。抗体SIRT1、促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、GAPDH为英国Abcam公司产品，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（cystein-asparate protease，caspase）-3、B细胞淋巴瘤/白血病-2（B cell lymphoma/lewkmia-2，Bcl-2）为美国Cell Signaling Technology (CST)公司产品，FoxO1为美国Novus Biologicals

公司产品，AMPKα为美国Gene Tex公司产品。

1.3 统计分析

试验数据以平均值±标准误（mean±SE）表示，采用SPSS 21.0统计分析软件中的单因素方差分析（one-way ANOVA），两两比较采用Tukey检验。P<0.05为差异显著，P<0.01为差异极显著，P>0.05为差异不显著。

2 结果与分析

2.1 牛皮下脂肪细胞的鉴定

油红O染色是鉴定脂肪细胞特异性方法，脂肪细胞内脂滴能被亲脂的油红O着色呈现红色，其他细胞因不含脂滴而无法被油红O染色，从而证明所培养的细胞为脂肪细胞。由图1可见，对照组和RES组均能被油红O染色，说明试验所用细胞为脂肪细胞。随着RES浓度的增加，油红O染色减少。

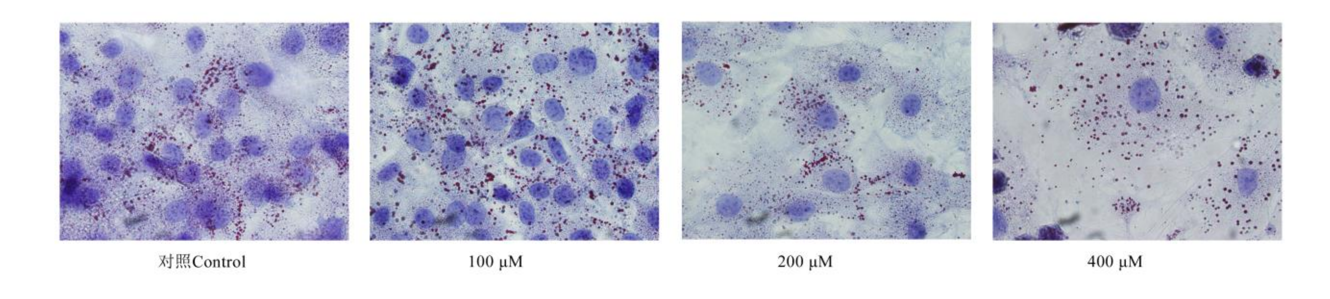


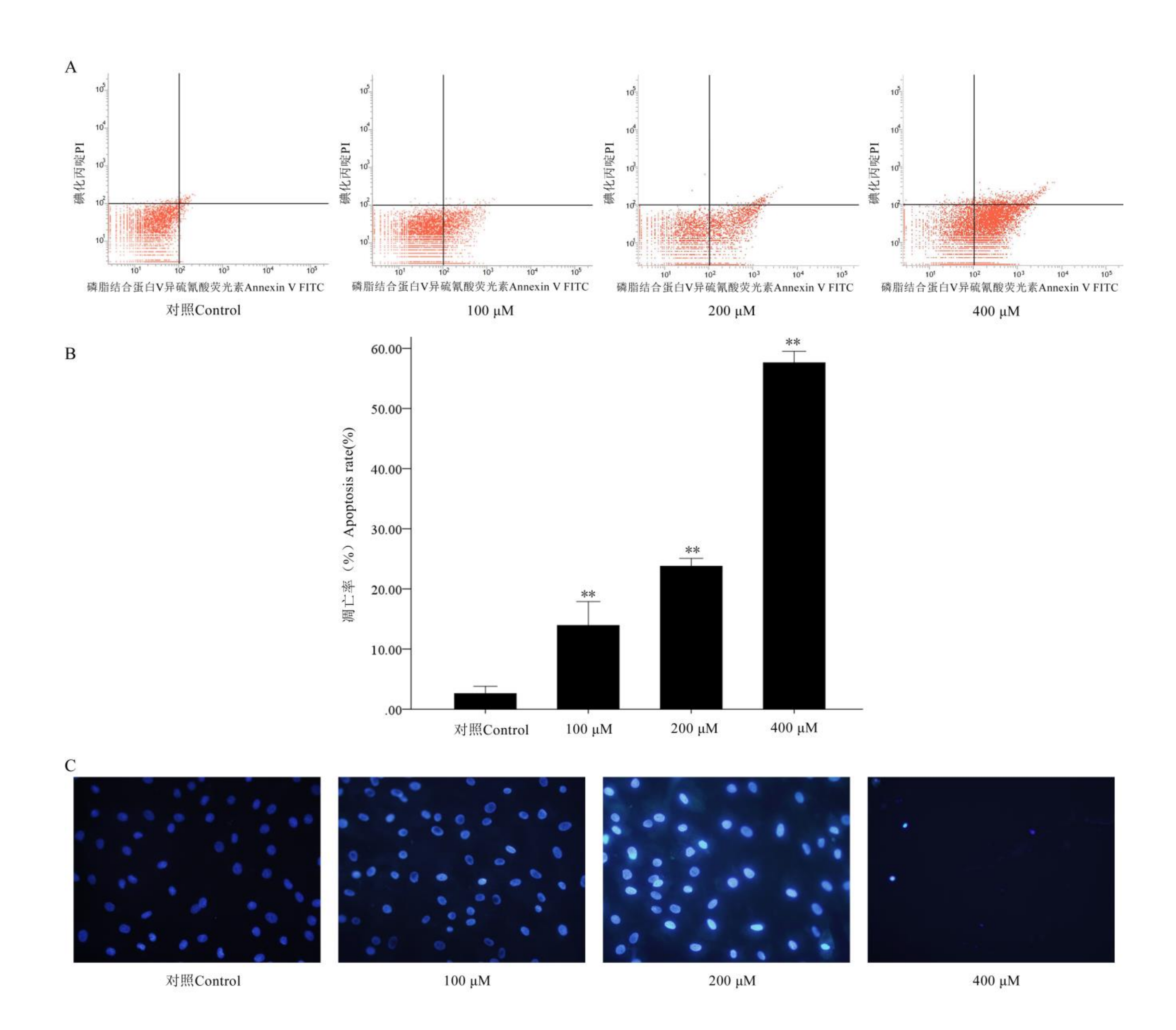
图1 油红O染色

Fig.1 Oil red O staining (200×)

2.2 白藜芦醇对牛皮下脂肪细胞凋亡的影响

由图2-A和图2-B可见，对照凋亡检测图和凋亡率，在牛皮下脂肪细胞分化第0天，用不同浓度的RES处理48 h，不同浓度的RES处理后的牛皮下脂肪细胞凋亡率均极显著高于对照组（P<0.01）。

Hoechst 33342可透过细胞膜，与DNA结合而发出强烈的蓝色荧光，常用于细胞凋亡检测。由图2-C可见，与对照组相比，RES处理48 h后，在荧光显微镜下观察到凋亡细胞的细胞核呈致密浓染，400 μmol/L浓度下因较多细胞凋亡脱落，故只观察到少量细胞，但均呈碎块状致密浓染。



A：RES 对牛皮下脂肪细胞凋亡流式细胞仪检测图。B：RES 对牛皮下脂肪细胞凋亡率的影响。C：Hoechst 33342 染色检测 RES 引起肉牛皮下脂肪细胞凋亡的形态学变化（200×）。

A: Apoptotic detection of figure by flow cytometry treated with RES. B: Effects of RES on apoptosis ratio of bovine subcutaneous adipocytes. C: Morphological changes of bovine subcutaneous adipocytes apoptosis exposed to RES by Hoechst 33342 staining (200×).

数据柱标*表示与对照组比较差异显著（P<0.05），**表示与对照组比较差异极显著（P<0.01），#表示与对照组比较差异不显著（P>0.05）。下图同。

Value columns with * mean significant difference compared with control group (P<0.05), and with ** mean extremely significant difference compared with control group (P<0.01), while with # mean no difference compared with control group (P>0.05). The same as below.

图2　白藜芦醇对肉牛皮下脂肪细胞凋亡的影响

Fig.2　Effects of RES on apoptosis of bovine subcutaneous adipocytes (n=3)

2.2　RES 对牛皮下脂肪细胞 *SIRT*1、*AMPKα*、*FoxO*1 的 mRNA 和蛋白质表达量的影响

由表3和图3可知，与对照组相比，*SIRT*1的mRNA表达量随着RES浓度增加显著或极显著提高（P<0.05或P<0.01），蛋白质表达量也是随着RES浓度增加极显著提高（P<0.01）；*AMPKα*的mRNA和蛋白质表达量显著或极显著提高（P<0.05或P<0.01）；RES浓度为200和400 μmol/L时，*FoxO*1的mRNA和蛋白质表达量显著或极显著提高（P<0.05或P<0.01）。RES浓度为100 μmol/L时，*FoxO*1的mRNA和蛋白质表达量与对照组差异不显著（P>0.05）。基因和蛋白质表达量基本呈现浓度依赖性。

表3　RES对牛皮下脂肪细胞基因mRNA表达量的影响

Table 3　Effects of RES on mRNA expression of bovine subcutaneous adipocytes genes (n=3)　%

基因	RES 浓度 RES concentration/(μmol/L)			
Genes	0（对照 control）	100	200	400
去乙酰化酶1 *SIRT*1	1.02±0.06	2.59±0.20*	4.14±0.41**	35.36±0.46**
腺苷一磷酸激活的蛋白激酶α *AMPKα*	1.01±0.08	2.37±0.02**	3.06±0.05**	5.29±0.11**
叉头转录因子1 *FoxO*1	1.01±0.07	1.80±0.23#	4.32±0.31*	44.30±1.24**
半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 Caspase-3	1.02±0.03	2.45±0.27*	4.46±0.31**	8.25±0.38**
B细胞淋巴瘤/白血病	1.02±0.03	0.80±0.01**	0.62±0.02**	0.41±0.03**

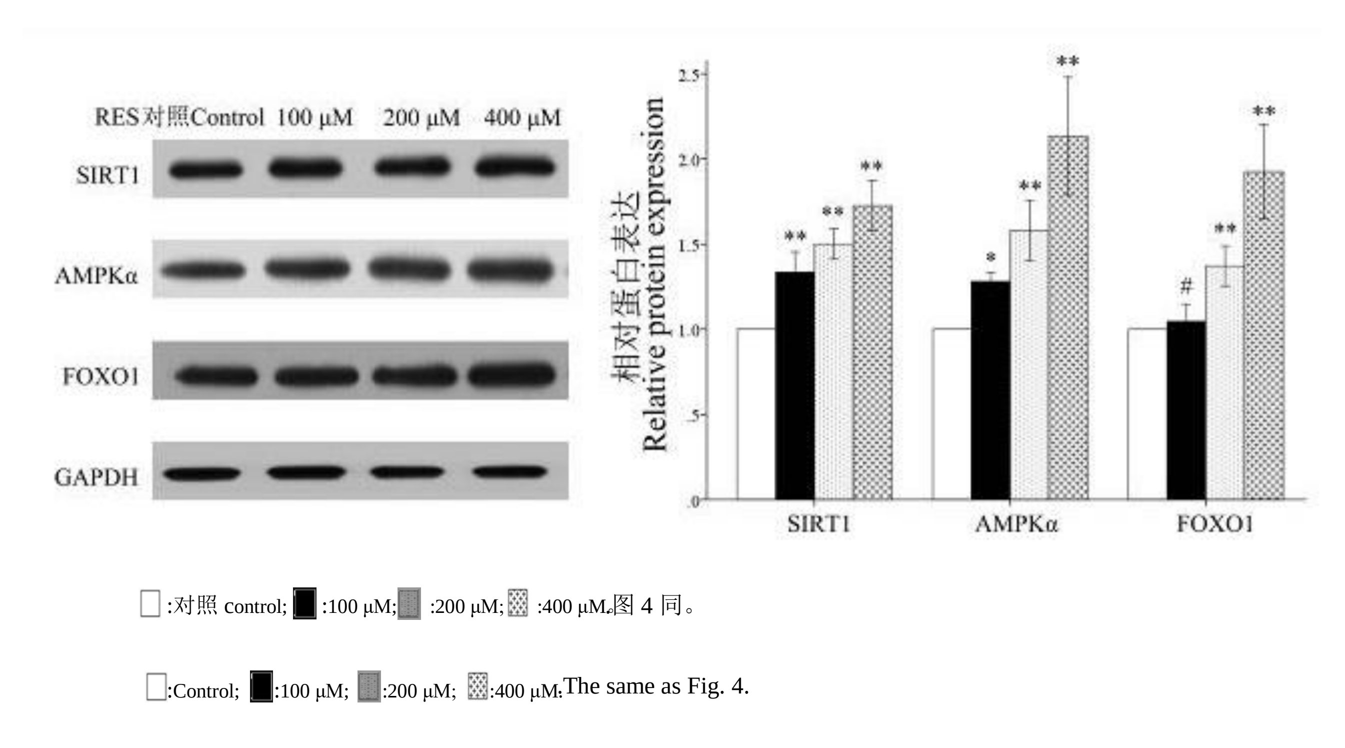
-2 *Bcl*-2

促凋亡蛋白Bcl-2相关	1.03±0.04	2.03±0.09*	3.99±0.25**	5.74±0.27**

X蛋白 *Bax*

同行数据肩标*表示与对照组比较差异显著（*P*<0.05），**表示与对照组比较差异极显著（*P*<0.01），#表示与对照组比较差异不显著（*P*>0.05）。

In the same row, values with * superscript mean significant difference compared with control group (*P*<0.05), and with ** superscript mean extremely significant difference compared with control group (*P*<0.01), while with # superscript mean no difference compared with control group (*P*>0.05).



:对照 control; :100 μM; :200 μM; :400 μM.图 4 同。

:Control; :100 μM; :200 μM; :400 μM.The same as Fig. 4.

图3　RES对SIRT1、AMPKα和FoxO1蛋白质表达量的影响

Fig.3　Effects of RES on protein expression of SIRT1, AMPKα and FoxO1

2.3　RES对肉牛皮下脂肪细胞caspase-3、*Bax*、*Bcl*-2的mRNA和蛋白质表达量的影响

由表 3 和图 4 可知，与对照组相比，*Bcl*-2 的 mRNA 表达量随着 RES 浓度增加极显著降低（*P*<0.01）；RES 浓度为 200 和 400 μmol/L 时，Bcl-2 蛋白质表达量也极显著降低（*P*<0.01）；caspase-3 的 mRNA 和蛋白质表达量显著或极显著提高（*P*<0.05 或 *P*<0.01）；*Bax* 的 mRNA 表达量显著或极显著提高（*P*<0.05 或

P<0.01），RES 浓度为 200 和 400 μmol/L 时，Bax 的蛋白质表达量极显著提高（*P*<0.01）。RES 浓度为 100 μmol/L 时，Bcl-2 和 Bax 的蛋白质表达量与对照组差异不显著（*P*>0.05）。

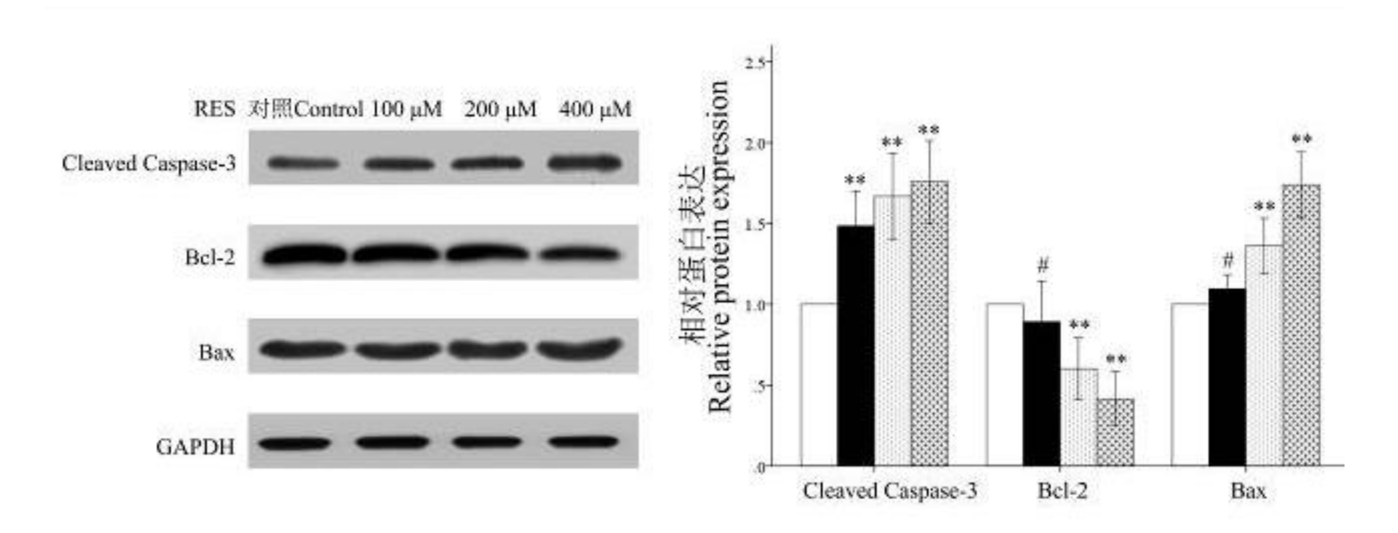


图4 RES对caspase-3、Bcl-2和Bax蛋白质表达量的影响

Fig.4 Effects of RES on protein expression of caspase-3, Bcl-2 and Bax

3 讨 论

3.1 RES 与脂肪细胞凋亡

由于脂肪细胞内存在大量脂滴，可阻止细胞皱缩及凋亡小体的形成，再加上由于脂肪细胞密度较小，易漂浮在液面上，操作中不易洗涤和分离，所以脂肪组织细胞凋亡研究起步较晚。细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡的过程，最重要的调节因子之一是 Bcl-2 家族，该家族根据功能不同分为 2 类：一类是促凋亡成员如 Bax、Bad 等，其通过提高线粒体的外膜通透性，增加线粒体中细胞色素 C 的释放，激活本身不具有生物催化活性的 caspase 酶原，最终导致细胞凋亡；另一类是抗凋亡成员如 Bcl-2、Bcl-xl 等，其能够通过稳定线粒体膜阻止细胞色素 C 的释放，从而对线粒体凋亡途径起负调控作用。

用 RES 处理 3T3-L1 前脂肪细胞研究凋亡现象，发现 SIRT1 的蛋白质表达量提高，caspase-3 和 caspase-9 被激活[12]。RES 特异性增加猪前体脂肪细胞 *SIRT*1 的表达活性，而 *SIRT*1 的上调影响 caspase-3 和 Bcl-2 家族因子的活性，同时参与调控肿瘤抑制因子 p53 和核转录因子 kappa B(*NF-κB*)的转录表达，推测 SIRT1 调控凋亡相关因子表达是 RES 诱导前体脂肪细胞凋亡的关键原因[13]。本研究中 RES 特异性增加肉牛脂肪细胞

*SIRT*1 的表达活性，caspase-3 和 *Bax* 的 mRNA 和蛋白质表达量升高，*Bcl*-2 的 mRNA 和蛋白质表达量降低，说明 RES 诱导牛脂肪细胞凋亡过程中，促凋亡因子的作用显著加强，抑制凋亡发生因子的作用能力减弱，最终导致凋亡现象的发生，与上述的研究结果基本相似[13]。而将鼠 H9c2 细胞置于缺氧环境下 24 h，发现细胞凋亡增加，而相同条件下再用 RES 处理 24 h，凋亡细胞明显减少[14]。用 RES 处理人类退变椎间盘髓核（disc nucleus pulposus，NP）细胞 48 h，可降低细胞的凋亡水平和 caspase-3 基因的激活，SIRT1 主要通过蛋白激酶 B(Akt)抗凋亡信号通路调控退变 NP 细胞的存活[15]。看来 RES 诱导的 SIRT1 对细胞凋亡的功能调节与细胞种类、细胞所处的阶段、环境等其他因素有很大关系。

RES 作为 SIRT1 的激活剂，在人和模型动物上进行了大量研究，但作为植物提取物，在动物尤其在反刍动物上进行的研究基本上集中在降低甲烷排放方面，本研究在 RES 对肉牛皮下脂肪细胞凋亡方面进行了初步探讨，对肉牛脂肪沉积调控方面需要做进一步系统详细的研究。

3.2　SIRT1/AMPK 信号通路与脂肪细胞凋亡

由于哺乳动物的AMPK属于高度保守的蛋白激酶家族，是蛋白激酶级联系统中的中心元件，在调节能量代谢的信号转导机制中起着枢纽作用；而SIRT1作为一种NAD^+依赖的组蛋白去乙酰化酶，通过细胞内氧化还原状态的改变而调控细胞的能量代谢平衡。研究表明，AMPK和SIRT1之间存在内在联系，从而在调节能量代谢过程中起着重要的调控作用。能量降低或AMPK激活导致*SIRT*1激活，可能是提高NAD^+或NAD^+/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）和/或烟酰胺磷酸核糖基转移酶（nicotinamide phosphoribosyl transferase，NAMPT），SIRT1去乙酰化并激活肝激酶B1（liver kinase B1，LKB1），随后激活AMPK[16-18]；RES通过激活*SIRT*1影响AMPK[19-21]。利用RES研究鼠3T3-L1前体脂肪细胞凋亡中发现，*SIRT*1激活，抑制Akt活性，同时也提高了AMPK活性，SIRT1/AMPK信号通路激活了线粒体介导的信号通路[12]。另外SIRT1将FoxO1、生肌决定因子(mysgenic determination gene，MyoD)、p53等许多转录因子作为底物发挥作用。RES可上调人内脏脂肪细胞中*SIRT*1、*FoxO*1和脂联素(adiponectin)基因表达[22]。与上述的研究结果相类似，本研究中RES特异性增加肉牛脂肪细胞*SIRT*1的表达活性，*AMPKα*和*FoxO*1的mRNA和蛋白质表达量也相应增加，说明RES诱导肉牛脂肪细胞凋亡过程中，激活SIRT1/AMPK信号通路，同时激活通路下游的*FoxO*1，促凋亡的作用显

著加强，导致凋亡现象。当然还有好多相反的研究结果，利用RES抑制人骨骼肌细胞中的AMPK信号通路[23]。研究发现AMPK的α2催化亚基异构体在肝细胞癌（HCC）中显著下调，*AMPK*的异位表达在肝癌细胞中增强了p53的乙酰化和稳定；p53去乙酰化使*SIRT*1的苏氨酸（Thr）-344位点可被AMPK所磷酸化，这造成SIRT1失活，从而促进p53的乙酰化和肝癌细胞的凋亡[24]。可见RES诱导的SIRT1/AMPK信号通路对细胞凋亡的功能调节比较复杂，既有抗凋亡作用，又有促凋亡作用，与细胞种类、处理的特异性、刺激的时间和强度等多种因素都有密切关联。

由于抗体的种属原因，本研究只检测了总蛋白水平，团队下一步将检测SIRT1/AMPK信号通路蛋白激酶及其亚基的磷酸化水平，以便了解白藜芦醇激活AMPK通路的具体作用机制。同时深入研究白藜芦醇对肉牛肌内脂肪细胞和肌细胞的影响以及大群饲养效果，为通过饲喂植物提取物等营养调控技术降低肉牛皮下脂肪沉积提供新思路。

4 结 论

RES通过激活SIRT1/AMPK信号通路，同时激活通路下游的*FoxO*1，促进肉牛皮下脂肪细胞的凋亡。

参考文献：

[1] PRINS J B,O'RAHILLY S.Regulation of adipose cell number in man[J].Clinical Science,1997,92(1):3–11.

[2] PRINS J B,WALKER N I,WINTERFORD C M,et al.Apoptosis of Human Adipocytes *in vitro*[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,1994,201(2):500–507.

[3] XIAO Y Y,YUAN T C,YAO W Q,et al.3T3-L1 adipocyte apoptosis induced by thiazolidinediones is peroxisome proliferator-activated receptor-γ-dependent and mediated by the caspase-3-dependent apoptotic pathway[J].FEBS Journal,2010,277(3):687–696.

[4] LIU X M,SONG E L,LIU G F,et al.Effect of SIRT1 on apoptosis of bovine preadipocytes[J].Progress in Biochemistry and Biophysics,2010,37(3):297–303.

[5] IMAI S,ARMSTRONG C M,KAEBERLEIN M,et al.Transcriptional silencing and longevity protein Sir

2 is an NAD-dependent histone deacetylase[J].Nature,2000,403(6771):795–800.

[6] MCCARTY M F.AMPK activation-protean potential for boosting healthspan[J].AGE,2014,36(2):641–663.

[7] VANG O,AHMAD N,BAILE C A,et al.What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol[J].PLoS One,2011,6(6):e19881.

[8] BITTERMAN J L,CHUNG J H.Metabolic effects of resveratrol:addressing the controversies[J].Cellular and Molecular Life Sciences,2015,72(8):1473–1488.

[9] MA T,CHEN D D,TU Y,et al.Effect of dietary supplementation with resveratrol on nutrient digestibility,methanogenesis and ruminal microbial flora in sheep[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2015,99(4):676–683.

[10] MOATE P J,WILLIAMS S R,TOROK V A,et al.Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2014,97(8):5073–5087.

[11] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J].Methods,2001,25(4):402–408.

[12] CHEN S F,XIAO X C,FENG X,et al.Resveratrol induces Sirt1-dependent apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes by activating AMPK and suppressing AKT activity and survivin expression[J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2012,23(9):1100–1112.

[13] PANG W J,XIONG Y,ZHANG Z,et al.Lentivirus-mediated Sirt1 shRNA and resveratrol independently induce porcine preadipocyte apoptosis by canonical apoptotic pathway[J].Molecular Biology Reports,2013,40(1):129–139.

[14] CHEN C J,YU W,FU Y C,et al.Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1–FoxO1 pathway[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2009,378(3):389–393.

[15] WANG D W,HU Z M,HAO J,et al.SIRT1 inhibits apoptosis of degenerative human disc nucleus pulposus cells through activation of Akt pathway[J].AGE,2013,35(5):1741–1753

[16] FULCO M,CEN Y N,ZHAO P,et al.Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt[J].Developmental Cell,2008,14(5):661–673.

[17] CANTÓ C,GERHART-HINES Z,FEIGE J N,et al.AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD^+ metabolism and SIRT1 activity[J].Nature,2009,458(7241):1056–1060.

[18] RUDERMAN N B,XU X J,NELSON L,et al.AMPK and SIRT1:a long-standing partnership?[J].American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,2010,298(4):E751–E760

[19] CANTÓ C,JIANG L Q,DESHMUKH A S,et al.Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle[J].Cell Metabolism,2010,11(3):213–219.

[20] UM J H,PARK S J,KANG H,et al.AMP-activated protein kinase–deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol[J].Diabetes,2010,59(3):554–563.

[21] PARK S J,AHMAD F,PHILP A,et al.Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases[J].Cell,2012,148(3):421–433.

[22] COSTA C D S,ROHDEN F,HAMMES T O,et al.Resveratrol upregulated SIRT1,FOXO1,and adiponectin and downregulated PPARgamma1–3 mRNA expression in human visceral adipocytes[J].Obesity Surgery,2011,21(3):356–361.

[23] SKROBUK P,VON KRAEMER S,SEMENOVA M M,et al.Acute exposure to resveratrol inhibits AMPK activity in human skeletal muscle cells[J].Diabetologia,2012,55(11):3051–3060.

[24] LEE C W,WONG L L Y,TSE E Y T,et al.AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells[J].Cancer Research,2012,72(17):4394–4404.

Resveratrol Induces Apoptosis of Bovine Adipocytes through Activiate of Sirtuin Type 1/Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase Signaling Pathway

CHENG Haijian[1,2] YOU Wei[1,2*] JIN Qing[1,2] LIU Yifan[1,2] WAN Fachun[1,2] SONG Enliang[1,2] LIU Guifen[1,2] TAN Xiuwen[1,2] ZHANG Xianglun[1,2] LIU Xiaomu[1,2**]

(1. *Institute of Animal Science and Veterinary Medicine*, *Shandong Academy of Agricultural Sciences*, *Jinan* 250100, *China; 2. Shandong Key Lab of Animal Disease Control and Breeding*, *Jinan* 250100, *China*)

Abstract: The aim of this study was to explore the effect of plant extracts resveratrol (RES) on the bovine adipocytes apoptosis ratio and key factors mRNA and protein expression in sirtuin type 1 (SIRTl)/adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. Bovine subcutaneous preadipocytes of 18-month-old *Luxi* yellow cattle were selected, on day 0 of cell differentiation, cells were treated with culture medium with 0 (control), 100, 200 and 400 μmol/L RES for 48 h, there were three replicates in each group. Hoechst 33342 staining was used to detect morphological changes of adipocytes apoptosis, the flow cytometry was used to detect the apoptosis ratio, quantitative real-time PCR (qPCR) and Western-blot were selected to detect the gene and protein expressions of SIRTl/AMPK signaling pathway related genes such as *SIRT*1, *AMPKα*, forkhead box protein O1 (*FoxO*1), B cell lymphoma/lewkmia-2 (*Bcl*-2), cystein-asparate protease-3 (caspase-3), Bcl-2 associated X protein (*Bax*), and oil red O stain was taken to identify the adipocytes. The results showed that compared with the control group, the adipocyte apoptosis rate after treatment with different concentrations of RES was extremely significantly increased ($P<0.01$); the mRNA expressions of *SIRT*1, *AMPKα*, caspase-3 and *Bax* after treatment with different concentrations of RES were significantly or extremely significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), but the *Bcl*-2 mRNA expression was extremely significantly decreased ($P<0.01$); the protein expressions of SIRT1, AMPKα and caspase-3 after treatment with different concentrations of RES were significantly or extremely significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); after treatment with 200 and 400 μmol/L RES, the mRNA and protein expressions of *FoxO*1 were significantly or extremely significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the Bax protein expression was extremely significantly increased ($P<0.01$), the Bcl-2 protein expression was extremely significantly decreased ($P<0.01$). After treatment with 100 μmol/L RES, the mRNA and protein expressions of *FoxO*1 and protein expressions of Bcl-2 and Bax had no significant difference compared with control group （$P>0.05$）. In conclusion, the regulation of apoptosis of bovine subcutaneous adipocytes by RES is throu

gh stimulation of AMPK/SIRT1 signaling pathway and activation pathway downstream of FoxO1, which provides a theoretical basis for reducing the caccumulation of subcutaneous fat by nutritional regulation techniques.

Key words: SIRT1; AMPK, FoxO1; resveratrol; bovine; adipocytes; apoptosis

*Contributed equally

**Corresponding author, associate professor, E-mail: xmliu2002@163.com

（责任编辑　武海龙）